

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①0 **DE 101 00 052 A 1**

⑤1 Int. Cl. 7:
A 61 K 38/05
A 61 K 31/198

②1 Aktenzeichen: 101 00 052.9
②2 Anmeldetag: 2. 1. 2001
④3 Offenlegungstag: 11. 7. 2002

(2)
§ 3(7) - Dole. !!

DE 101 00 052 A 1

⑦1 Anmelder:
Institut für Medizintechnologie Magdeburg GmbH,
IMTM, 39120 Magdeburg, DE

⑦4 Vertreter:
Koepe & Partner Patentanwälte, 80538 München

⑦2 Erfinder:
Ansorge, Siegfried, Prof. Dr., 39291 Hohenwarthe,
DE; Lendeckel, Uwe, Dr., 39120 Magdeburg, DE;
Neubert, Klaus, Prof. Dr., 06120 Halle, DE; Reinhold,
Dirk, Dr., 39120 Magdeburg, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
US 60 96 713 A
Kähne, Th. [u.a.]: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth. In: Int. J. Mol. Med., 1999, H.4, S.3-15;
Lendeckel, U. [u.a.]: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. In: Int. J. Mol. Med., 1999, H.4, S.17-27;
CANCERLIT-Abstr. 92198405: Ansorge, S. [u.a.]: Membranebound peptidases of lymphocytes: functional implications. In: Biomedica Biochimica Acta, 1991, Vol.50, No.4-6, S.799-807;
BIOSIS-Abstr. 2000:387311, Stoeckel-Maschek, A. [u.a.]: Thixo amino acid pyrrolidides and thiazolidides: New Inhibitors of proline specific peptidases. In: Biochimica et Biophysica Acta, 2000, Vol.1479, No.1-2, S.15-31;
DPFU-Abstr. 1996-00109, Li J. [u.a.]: Aminoacyl-pyrrolidine-2-nitriles: potent and stable inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV In: Arch. Biochem. Biophys., 1995, Vol.323, No.1, S.148-154;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Kombinierte Verwendung von Enzyminhibitoren und pharmazeutischen Zubereitungen daraus zur Therapie und Prophylaxe der Atherosklerose

⑤7 Die Erfindung beinhaltet ein Verfahren zur Hemmung der DNS-Synthese und damit der Proliferation von Immunzellen, sowohl mononukleärer Zellen als auch T-Lymphozyten, durch die gleichzeitige und gemeinsame Wirkung von Inhibitoren der (I) Alanyl-Aminopeptidase und Dipeptidylpeptidase IV, (II) der Dipeptidylpeptidase IV und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, (III) der Dipeptidylpeptidase IV und Prolyloligopeptidase sowie (IV) der Dipeptidylpeptidase IV und der X-Pro-Aminopeptidase.

Die DNS-Synthese und damit die Proliferation der Immunzellen wird dabei in einem Ausmaß gehemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzyminhibitoren - auch bei höherer Dosierung - nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich den gleichen Prozess, nämlich die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren nicht vollständig und nicht dauerhaft. Aus der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine additive/superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung mehrerer der genannten Enzyme bzw. der gleichzeitigen Beeinflussung deren biologischer Aktivitäten.

Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie und Prävention von Autoimmun- und chronischen Erkrankungen mit ent-

zündlicher Genese wie der Atherosklerose die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der oben genannten ...

DE 101 00 052 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung beschreibt die Hemmung der DNS-Synthese und damit der Proliferation von Immunzellen durch die kombinierte Wirkung von Inhibitoren der Amino-peptidase N (APN, EC 3.4.11.2, CD13), der Dipeptidylpeptidase IV (DF IV, EC 3.4.14.5, CD26), der Prolyl-oligo-peptidase (POP, Prolyl-endo-peptidase, PEP, EC 3.4.21.26), der membranständigen Amino-peptidase P (X-Pro-Amino-peptidase, APP, XPNPEP2, EC 3.4.11.9) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms, (angiotensin-converting enzyme, ACE, EC 3.4.15.1, CD156) bzw. durch die kombinierte Hemmung der Aktivität der genannten Enzyme im Ergebnis der simultanen Applikation von jeweils spezifischen Inhibitoren dieser Enzyme auf der Basis von Aminosäurederivaten, Peptiden oder Peptidderivaten, durch welche die Aktivierung, die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen supprimiert wird.

[0002] Für alle Erkrankungen mit Autoimmunpathogenese gilt, dass eine Aktivierung und Proliferation von Immunzellen, insbesondere von autoreaktiven T-Zellen, dem Krankheitsprozess zugrunde liegen bzw. diesen ausmachen. Ähnliche Mechanismen kommen bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose zur Wirkung, wo T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei Entstehung und Chronifizierung des Krankheitsprozesses spielen.

[0003] Es ist gezeigt worden, dass im Prozess der Aktivierung und klonalen Expansion von Immunzellen, insbesondere von T-Lymphozyten, membranständige Peptidasen wie DP IV oder APN eine Schlüsselrolle spielen [Fleischer B: CD26 a surface protease involved in T-cell activation. *Immunology Today* 1994; 15: 180-184; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells. *International Journal of Molecular Medicine* 1999; 4: 17-27; Riemann D et al.: CD13 - not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today* 1999; 20: 83-88]. Verschiedene Funktionen mitogen-stimulierter mononukleärer Zellen (MNZ) oder angereicherter T-Lymphozyten wie DNS-Synthese, Produktion und Sekretion von immunstimulierenden Zytokinen (IL-2; IL-6, IL-12, IFN- γ) und Helferfunktionen für B-Zellen (IgG- und IgM-Synthese) können in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der DP IV und der APN gehemmt werden [Schön E et al.: The dipeptidyl peptidase IV, a membrane enzyme involved in the proliferation of T lymphocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 1985; 2: K9-K15; Schön E et al.: The role of dipeptidyl peptidase IV in human T lymphocyte activation. Inhibitors and antibodies against dipeptidyl peptidase IV suppress lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis in vitro. *Eur. J. Immunol.* 1987; 17: 1821-1826; Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMC and T cells. *Immunology* 1997; 91: 354-360; Lendeckel U et al.: Induction of the membrane alanyl aminopeptidase gene and surface expression in human T-cells by mitogenic activation. *Biochem. J.* 1996; 319: 817-823; Kähne T et al.: Dipeptidyl peptidase IV: A cell surface peptidase involved in regulating T cell growth (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 3-15; Lendeckel U et al.: Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (Review). *Int. J. Mol. Med.* 1999; 4: 17-27].

[0004] Auf der anderen Seite haben wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre die Atherosklerose als eine entzündliche Erkrankung charakterisiert, wobei den T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle für die Entstehung und Entwicklung der Erkrankung zukommt [Ross R: Atherosclerosis- an inflammatory disease. *New Engl. J. Med.* 1999; 340 (2): 115-126]. Demnach werden atherosklerotische Läsionen als eine Serie spezifischer zellulärer und molekularer Reaktionen verstanden, die zusammengenommen eindeutig als Entzündung zu charakterisieren sind. Solche Läsionen, die hauptsächlich in großen und mittleren elastischen und muskulösen Arterien vorkommen, führen zu Ischämie (Durchblutungsstörungen) von Herz, Hirn und Extremitäten bis hin zu Infarkten in den genannten Organen. Atherosklerotische Läsionen bilden sich an definierten arteriellen Orten, wo Abzweigungen und Kurven charakteristische Veränderungen des Blutflusses und der Scherkräfte sowie die Ausbildung von Turbulenzen bewirken [Gotlieb AI et al.: The role of rheology in atherosclerotic coronary artery disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary ather disease*. Vol. 1 Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 595-606]. Gefäßendothel-Zellen bilden dann an diesen Orten spezifische Moleküle, die für die Attraktion, Bindung, Akkumulation sowie Aktivierung von T-Lymphozyten und Monozyten verantwortlich sind. T-Lymphozyten sind wesentliche inflammatorische Zellen in allen Phasen der Atheriogenese. T-Zellen infiltrieren aus dem peripheren Blut in die atherosklerotischen Plaques und vermehren sich am Ort der Läsion [Jonasson L et al.: Regional accumulation of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986; 6: 131-138; von der Wal AC et al.: Atherosclerotic lesions in humans: in situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab. Invest.* 1989; 61: 166-170]. Im Ergebnis dieser Anhäufung aktivierter T-Lymphozyten, die sich durch eine starke Expression der Alanylaminopeptidase und der Dipeptidyl-Peptidase IV auszeichnen, am Ort der atherosklerotischen Läsion werden Chemokine, Zytokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen freigesetzt, die zur weiteren Verstärkung des Krankheitsgeschehens führen, indem andere Immunzellen rekrutiert und aktiviert werden [Libby P and Ross R. Cytokines and growth regulatory molecules. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary ather disease*. Vol. 1 Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 585-594].

[0005] Auch Monozyten, die in atherosklerotischen Plaques lokalisiert sind, zeichnen sich durch die konstitutive Expression von z. B. Alanylaminopeptidase (APN) aus und sind, wie unsere Arbeiten zeigen, nachhaltig durch Hemmstoffe der oben beschriebenen Enzyme in ihrem Wachstum und ihrer Funktion zu supprimieren. Gleiches gilt für Endothelzellen, die ebenfalls diese Ektopeptidasen exprimieren.

[0006] Dem Angiotensin-konvertierenden Enzym kommt eine besondere Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose zu: Dieses Enzym bewirkt die Bildung des stark blutdrucksteigernden Angiotensin II (Ang II) aus dem Ang I. Hypertonie ist ein wichtiger Risikofaktor für Atherosklerose und betroffene Patienten haben oft erhöhte Ang II-Spiegel. Daneben ist Ang II pro-atherogen, indem es das Wachstum von glatten Muskeln (Gefäße) stimuliert [Chobanian AV et al. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary ather disease*. Vol. 1 Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996: 237-242; Gibbons GH et al. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. Hyperplasia: autocrine TGF- β 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin. Invest.* 1992; 90: 456-461]. Ang II verstärkt die Entzündungsreaktion darüberhinaus auch über die Erhöhung der Lipoxxygenase-Aktivität, wodurch entzündungsfördernde Mediatoren verstärkt freigesetzt werden.

[0007] Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, dass die gleichzeitige Wirkung von Inhibitoren der enzymatischen Aktivitäten bzw. die gleichzeitige Beeinflussung der biologischen Aktivitäten von (I) Dipeptidylpeptidase

IV und Amino-peptidase N, (II) der Dipeptidylpeptidase IV und des "angiotensin-converting enzyme", (III) der Dipeptidylpeptidase IV und der Prolylloleptidase sowie (IV) der Dipeptidylpeptidase IV und der X-Pro-Amino-peptidase die DNS-Synthese und damit die Proliferation von mononukleären Zellen (MNZ) als auch von T-Zellen in einem Ausmaß hemmt, das durch die einzelne Applikation dieser Enzym-inhibitoren – auch bei höherer Dosierung – nicht erreicht werden kann. Obgleich die genannten Inhibitoren letztendlich den gleichen Prozess, nämlich die DNS-Synthese und damit die Proliferation von Immunzellen, beeinflussen, ist dieser Effekt bei einzelner Applikation der Inhibitoren wesentlich schwächer ausgeprägt und nicht dauerhaft. Wegen der funktionellen Überschneidung der enzymatischen Aktivitäten der genannten Enzyme resultiert, wie unsere Daten zeigen, eine superadditive Hemmwirkung auf DNS-Synthese und Proliferation aus der gleichzeitigen Hemmung von zwei oder mehreren dieser Enzyme.

[0008] · Unsere Erfindung zeigt, dass zur Therapie von entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose, für deren Entstehung die Proliferation und die Aktivierung von T-Lymphozyten eine zentrale Rolle Bedeutung hat, die gleichzeitige Applikation von Hemmstoffen der oben genannten Enzyme bzw. entsprechender Zubereitungen und Darreichungsformen daraus geeignet sind.

[0009] Im einzelnen liegen der Erfindung die Befunde zugrunde, dass die DNS-Synthese von MNZ und T-Zellen durch die simultane Administration von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität von

- I. Dipeptidylpeptidase IV und Amino-peptidase N,
- II. Dipeptidylpeptidase IV und Angiotensin-konvertierendem Enzym,
- III. Dipeptidylpeptidase IV und Prolylloleptidase
- IV. Dipeptidylpeptidase IV und X-Pro-Amino-peptidase

in superadditiver Weise inhibiert wird.

[0010] Die Applikation von Enzym-inhibitoren stellt bei den genannten Erkrankungen eine neuartige Methode und ergänzende Therapieform dar.

[0011] Die erfindungsgemäß applizierten Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV, der Amino-peptidase N, der Prolylloleptidase, des "angiotensin-converting enzyme" und der X-Pro-Amino-peptidase können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, inhibitorisch wirkende Peptide und Peptid-derivate sowie als Antikörper dieses Enzyms zur Anwendung kommen. Bevorzugte Effektoren sind beispielsweise für die DP IV Xaa-Pro-Dipeptide, entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide ($n = 0-10$), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure/Iminosäure bzw. ein α -Aminosäurederivat/Iminosäurederivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate. Derartige Verbindungen und deren Herstellung wurden in einem früheren Patent beschrieben (K. Neubert et al. DD 296 075 A5).

[0012] Die Inhibitoren werden simultan mit bekannten Trägerstoffen verabreicht. Die Verabreichung erfolgt einerseits als topische Applikation in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln einschließlich instilativer Applikation und andererseits als systemische Applikation zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären Anwendung in geeigneten Rezepturen bzw. in geeigneter Galenik.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

[0013] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ³[H]-Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 1 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

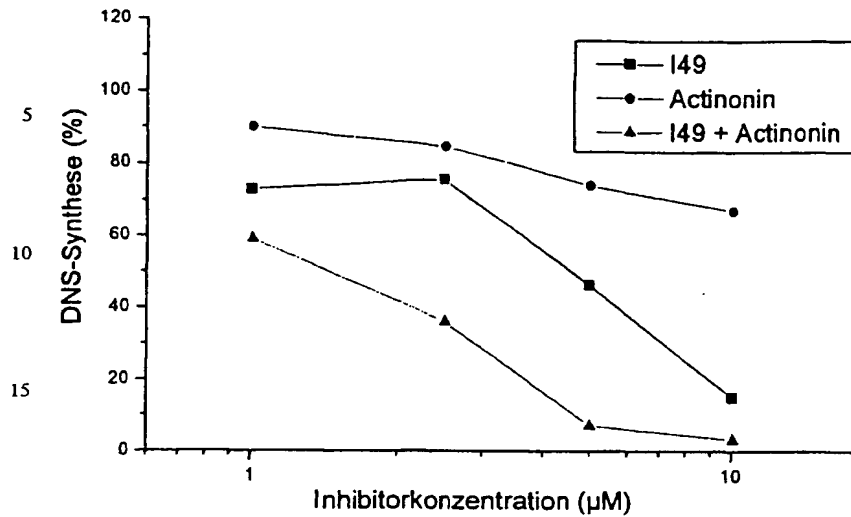


Abb. 1

[0014] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Aminopeptidase N (Actinonin) auf die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten. Humane periphere T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ^3H -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ^3H -Thymidin gemessen.

Beispiel 2

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der APN

[0015] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und APN (Actinonin) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ^3H -Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 2 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

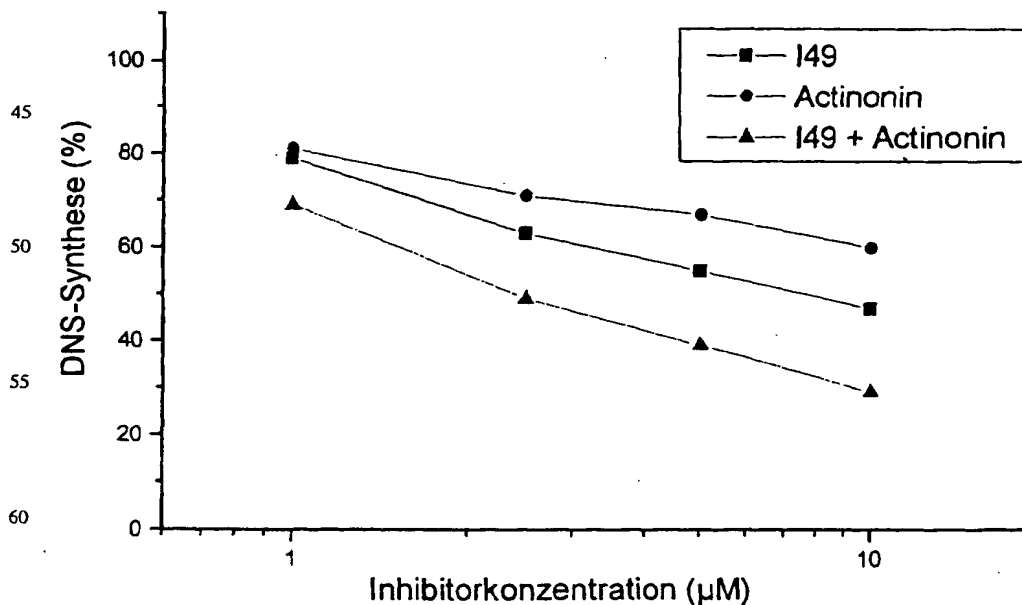


Abb. 2

[0016] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der APN (Actinonin) auf die

DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ^3H -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ^3H -Thymidin gemessen.

Beispiel 3

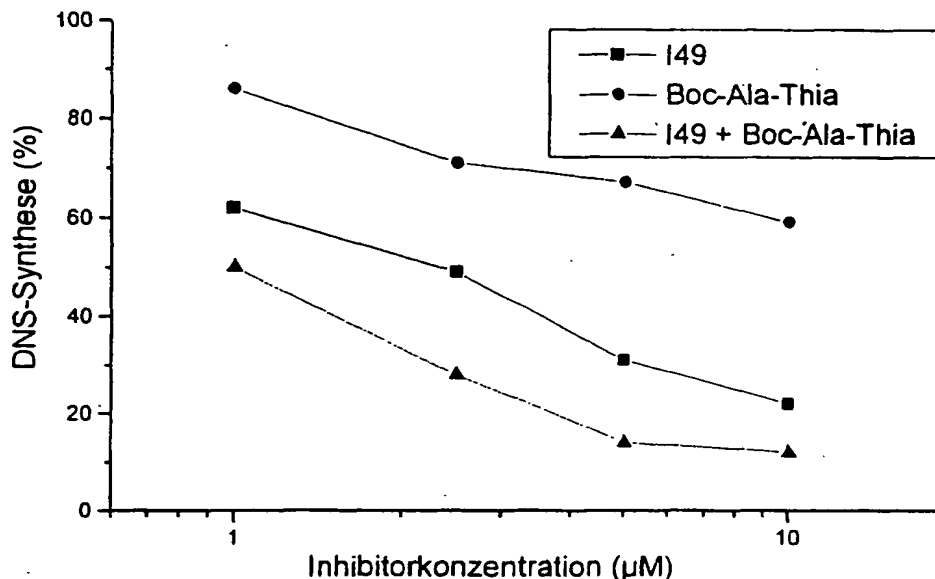
5

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der POP

[0017] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und der Prolylloligopeptidase (Boc-Ala-Thiazolidid) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ^3H -Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 3 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

10

15



20

25

30

35

Abb. 3

40

[0018] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Prolylloligopeptidase (Boc-Ala-Thia) auf die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ^3H -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ^3H -Thymidin gemessen.

45

Beispiel 4

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und der POP

50

[0019] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und der Prolylloligopeptidase (Boc-Ala-Thiazolidid) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ^3H -Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 4 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

55

60

65

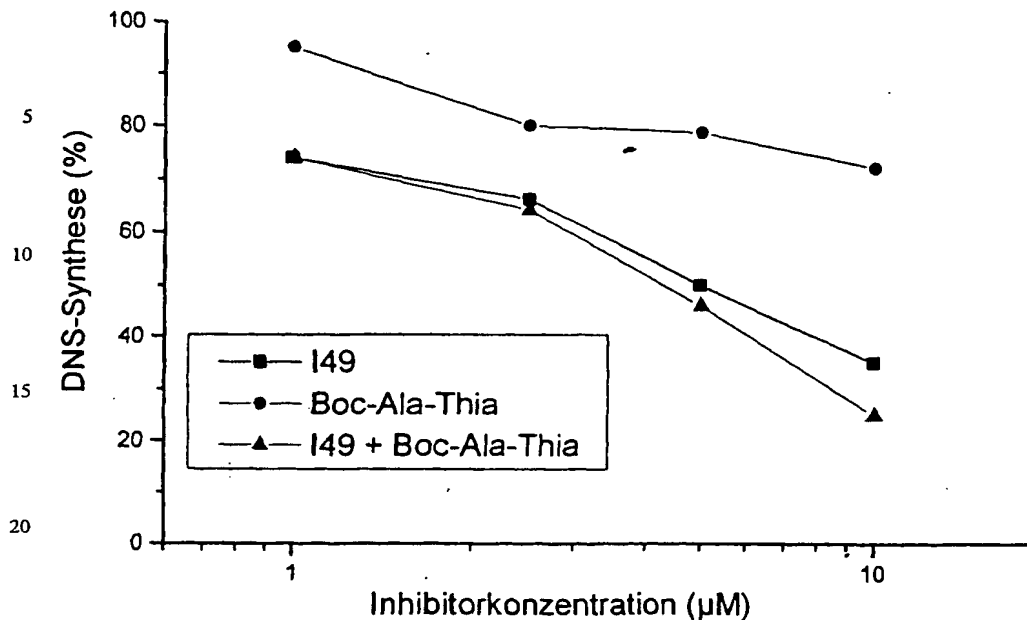


Abb. 4

[0020] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und der Prolyloligopeptidase (Boc-Ala-Thia) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ^3H -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ^3H -Thymidin gemessen.

Beispiel 5

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen T-Lymphozyten durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und des ACE

[0021] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner T-Lymphozyten durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die T-Zellen wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ^3H -Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor β 1 in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 5 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

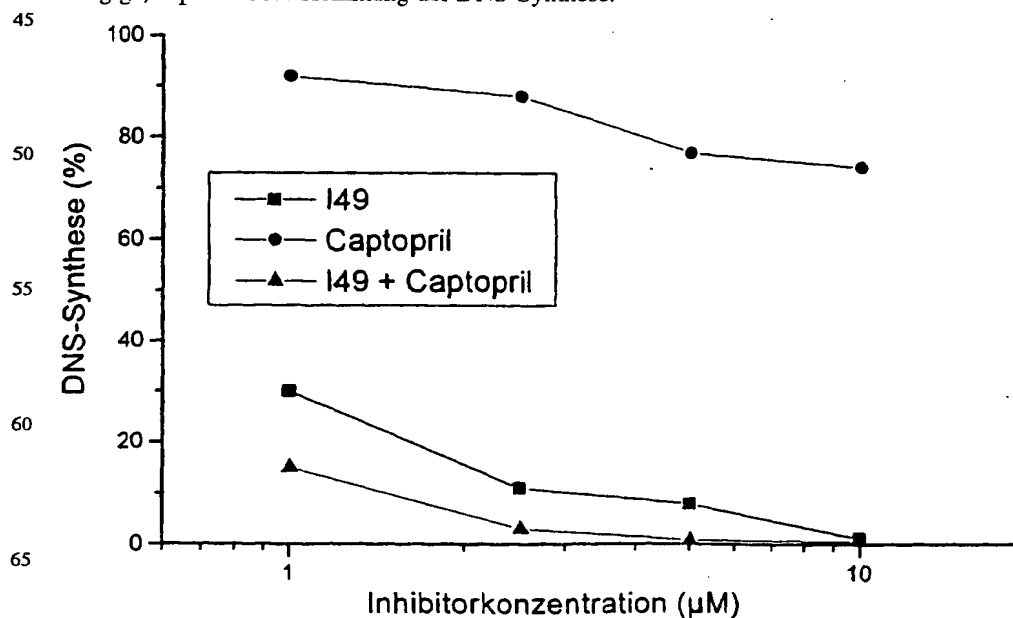


Abb. 5

[0022] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) auf die DNS-Synthese humaner peripherer T-Lymphozyten. Humane T-Zellen wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ^3H -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ^3H -Thymidin gemessen.

Beispiel 6

Inhibierung der DNS-Synthese von humanen peripheren mononukleären Zellen durch Inkubation mit synthetischen Inhibitoren der DP IV und des ACE

[0023] Unsere Untersuchungen zeigten, dass die DNS-Synthese humaner peripherer mononukleärer Zellen (MNZ) durch die simultane Administration von Inhibitoren der DP IV (Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid = I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) in superadditiver Weise gehemmt wird. Die MNZ wurden 72 h in Gegenwart der genannten Inhibitoren inkubiert und anschließend über die Messung der ^3H -Thymidin-Inkorporation die DNS-Synthese bestimmt, wie bei Reinhold et al. beschrieben (Reinhold D et al.: Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV induce secretion of transforming growth factor $\beta 1$ in PWM-stimulated PBMNC and T cells. Immunology 1997; 91: 354–360). Abb. 6 zeigt die dosisabhängige, superadditive Hemmung der DNS-Synthese.

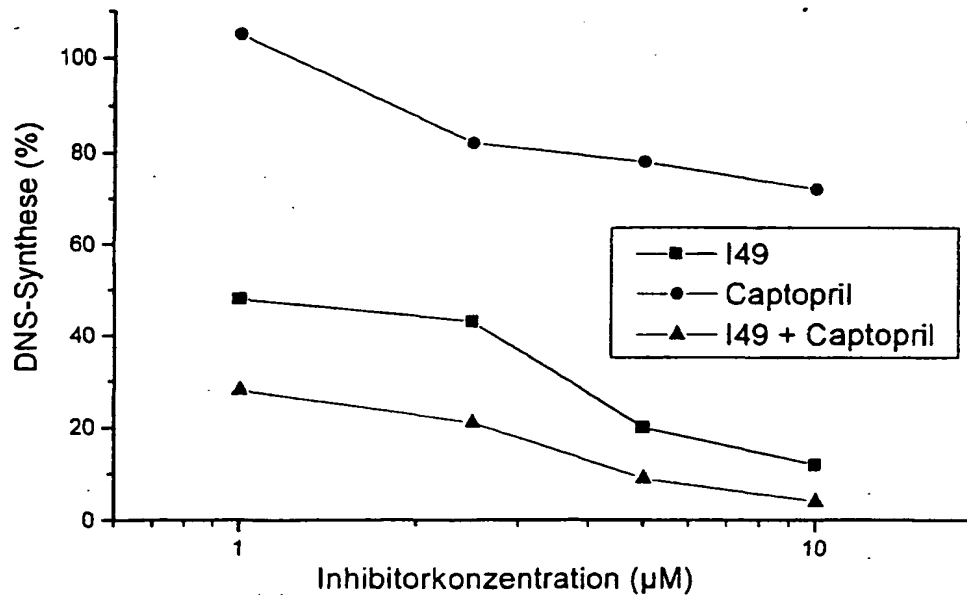


Abb. 6

[0024] Synergistischer und dosisabhängiger Effekt von Inhibitoren der DP IV (I49) und des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (Captopril) auf die DNS-Synthese humaner mononukleärer Zellen (MNZ). Humane MNZ wurden über drei Tage mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde dem Kulturmedium ^3H -Methyl-Thymidin zugesetzt und nach weiteren 6 Stunden die in die DNS eingebaute Menge an ^3H -Thymidin gemessen.

Beispiel 7

Hemmung der Proliferation von humanen peripheren mononukleären Zellen (MNZ) durch die einzelne und gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) und APN (Actinonin)

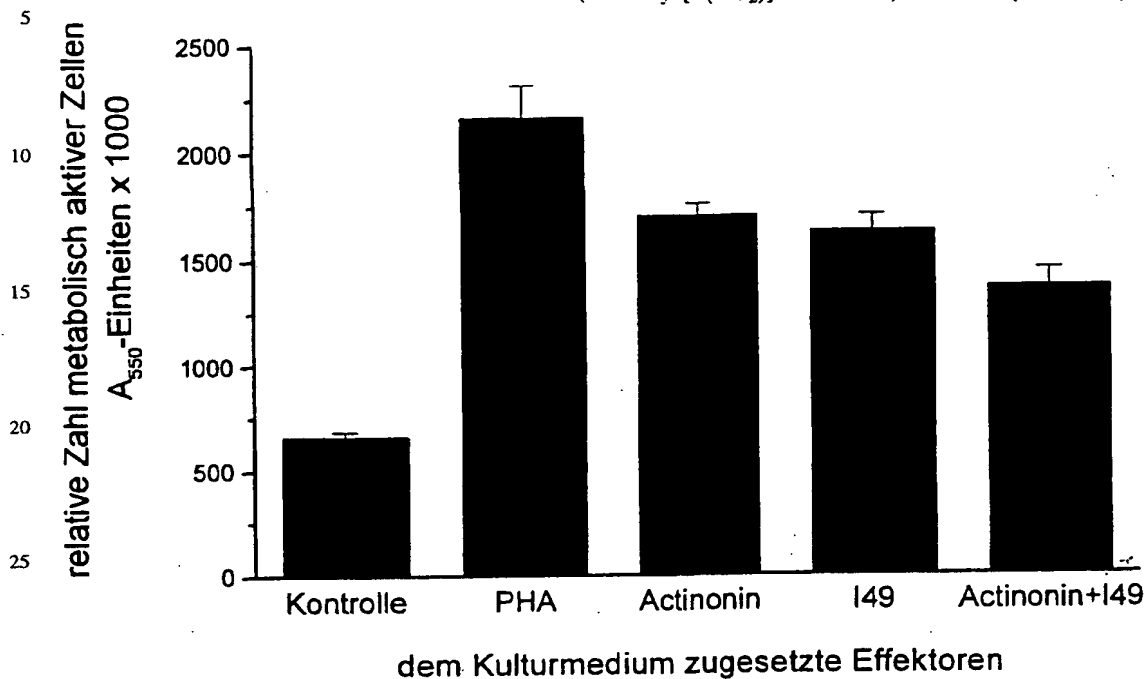


Abb. 7

[0025] Die MNZ wurden über einen Zeitraum von 72 h ohne Zusatz (Kontrolle), mit dem mitogenen Lektin Phytohämagglutinin (PHA) bzw. mit PHA und den angegebenen Inhibitoren inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

Beispiel 8

Hemmung der Proliferation der humanen T-Zelllinie KARPAS-299 durch die einzelne und gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) und APN (Actinonin und Probestin)

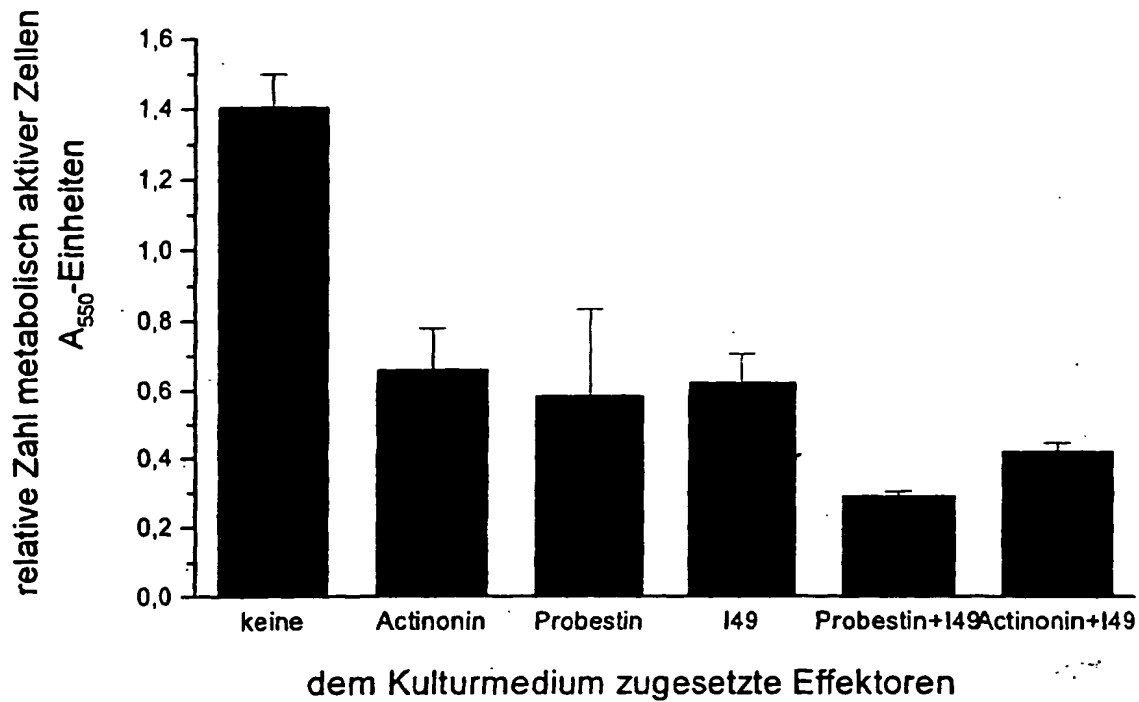


Abb. 8

[0026] Die KARPAS-299-Zellen wurden über einen Zeitraum von 72 h ohne Zusatz (Kontrolle) bzw. in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

Beispiel 9

Hemmung der Proliferation aktivierter, humaner peripherer T-Zellen durch die einzelne bzw. gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys(Z(NO₂))-thiazolidid) und APN (Actinonin und Probestin)

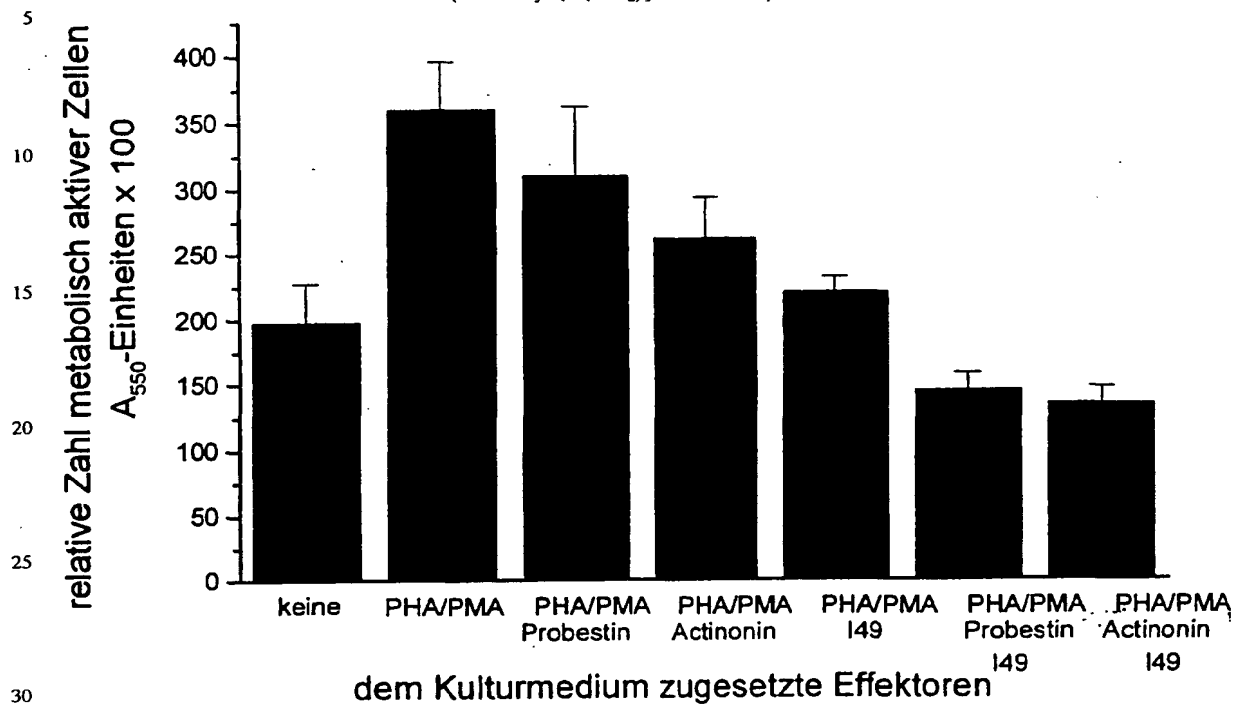


Abb. 9

[0027] Die T-Zellen wurden mit Ausnahme der unbehandelten Kontrolle durch Zugabe zum Kulturmedium von Phytohämagglutinin und Phorbol-12-myristat-13-acetat aktiviert und über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

Beispiel 10

Hemmung der Proliferation PHA-aktivierter, humaner mononukleärer Zellen (MNZ) durch die einzelne bzw. gleichzeitige Gabe von Hemmstoffen der DP IV (I49 = Lys[Z(NO₂)]-thiazolidid) und der X-Pro-Aminopeptidase (APP) (Apstatin)

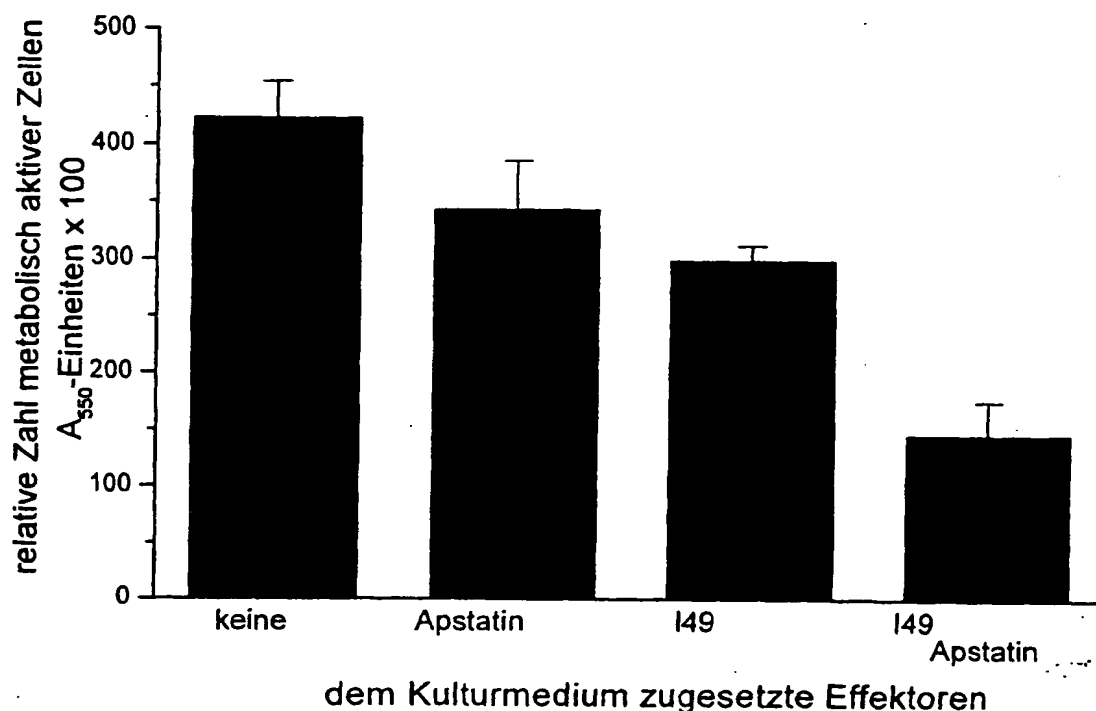


Abb. 10

[0028] Die mononukleären Zellen (MNZ) wurden über einen Zeitraum von 72 h in Gegenwart der angegebenen Inhibitoren einzeln sowie in Kombination inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zahl metabolisch aktiver Zellen unter Verwendung des kommerziell verfügbaren WST-1 Zell-Proliferations-Assays (Takara Inc.) nach Angaben des Herstellers.

Patentansprüche

1. Verwendung von Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) sowie von Enzymen mit gleicher Substratspezifität (DP IV-analoge Enzymaktivität) in Kombination mit Inhibitoren der Alanyl-Aminopeptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzymen gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), der X-Pro-Aminopeptidase (Aminopeptidase P, APP), des "angiotensin-converting enzyme" (ACE) und/oder der Prolyl oligopeptidase (POP, Prolyl oligopeptidase, PEP) zur additiven bzw. superadditiven Hemmung von Aktivierung, DNS-Synthese und Proliferation humaner T-Lymphozyten bzw. mononukleärer Zellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester, Dipeptidboronsäuren (z. B. Proboro-Pro) und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide (Xaa = α -Aminosäure, n = 0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze sind, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. ein seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise NE-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.
3. Verwendung nach Anspruch 1, worin Aminosäureamide, z. B. N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat bevorzugt als DP IV-Inhibitoren eingesetzt werden.
4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei als Inhibitoren der APN bevorzugt Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastin, Bestatin, Probestin, β -Aminothiole, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivate, vorzugsweise D-Phe-y[PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze als Inhibitoren der APP bevorzugt Apstatin, (2S,3R)-HAMH-L-Prolin, (2S,3R)-HAPB-L-Prolin, die entsprechenden L-Prolinmethylester, (2S,3R)-HAMH-/(2S,3R)-HAPB-pyrrolidide, -thiazolidide (HAMH = 3 Amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl, HAPB = 3-Amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl) und deren Salze als Inhibitoren des ACE bevorzugt Captopril, Enalapril, Lisinopril, Cilazopril und deren Salze als Inhibitoren der POP (PEP) bevorzugt Posiatin, Eurystatin A oder B, N^α-geschützte Peptidaldehyde, vorzugsweise Benzyloxycarbonyl-L-Prolyl-L-Prolinal bzw. Benzyloxycarbonyl-L-Thiopropyl-L-Thioprolinal, N^α-geschützte Aminosäure(Xaa)-pyrrolidide bzw. -thiazolidide (Xaa = α -Aminosäure, bevorzugt L-Alanin, L-Valin, L-

Isoleucin) sowie die entsprechenden 2-Cyanopyrrolidid- bzw. 2-Cyanothiazolididderivate, substratanaloge N^a-geschützte Peptidphosphonsäurediarylester bzw. Peptiddiazo-methylketone bzw. Peptidammoniummethylketone und deren Salze fungieren.

5. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Vorbeugung und Therapie von Autoimmunerkrankungen, vorzugsweise Rheumatoide Arthritis, Lupus erythematoses, Multiple Sklerose, IDDM, Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, Psoriasis, Neurodermitis, Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis, Vaskulitis, autoimmune Schilddrüsenerkrankungen oder autoimmunhämolytische Anämie, sowie anderen chronischen Erkrankungen mit entzündlicher Genese wie Arteriosklerose.

6. Verwendung von Inhibitorkombinationen nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Unterdrückung von Transplantat-Abstoßung und zur Therapie von Tumorerkrankungen.

7. Pharmazeutische Zubereitungen, umfassend Inhibitoren der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV) oder DP IV-analoger Enzymaktivität in Kombination mit Inhibitoren eines der Enzyme Alanyl-Amino-peptidase (Aminopeptidase N, APN) bzw. Enzyme gleicher Substratspezifität (APN-analoge Enzymaktivität), X-Pro-Amino-peptidase (Aminopeptidase P, APP), "angiotensin-converting enzyme" (ACE) und Prolyl-oligo-peptidase (POP, Prolylendopeptidase, PEP) und in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Zusatz- und/oder Hilfsstoffen.

8. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7, umfassend als Inhibitoren der DP IV bevorzugt Xaa-Pro-Dipeptide (Xaa = α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschützte Derivate), entsprechende Derivate, vorzugsweise Dipeptidphosphonsäurediarylester und deren Salze, Xaa-Xaa-(Trp)-Pro-(Xaa)_n-Peptide (Xaa = α -Aminosäuren, n = 0-10), entsprechende Derivate und deren Salze bzw. Aminosäure (Xaa)-amide, entsprechende Derivate und deren Salze, wobei Xaa eine α -Aminosäure bzw. seitenkettengeschütztes Derivat, vorzugsweise N^ε-4-Nitrobenzyloxycarbonyl-L-Lysin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Isoleucin, L-Valin ist und als Amidstruktur cyclische Amine, z. B. Pyrrolidin, Piperidin, Thiazolidin und deren Derivate fungieren.

9. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7, umfassend als Inhibitoren der DP IV vorzugsweise Aminosäureamide, z. B. N^ε-4-Nitrobenzyloxy-carbonyl-L-Lysin-thiazolidid, -pyrrolidid und -piperidid sowie das entsprechende 2-Cyanothiazolidid-, 2-Cyanopyrrolidid- und 2-Cyanopiperididderivat.

10. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 7 umfassend als Inhibitoren der APN, APP, ACE und POP (PEP), vorzugsweise Actinoin, Leuhistin, Phebestin, Amastin, Bestatin, Probestin, β -Aminothiole, α -Aminophosphinsäuren, α -Aminophosphinsäurederivate, bevorzugt D-Phe-y[PO(OH)-CH₂]-Phe-Phe und deren Salze als APN-Inhibitoren, Apstatin, (2S,3R)-HAMH-L-Prolin, (2S,3R)-HAPB-L-Prolin, die entsprechenden L-Prolinmethylester, (2S,3R)-HAMH-/(2S,3R)-HAPB-pyrrolidide, -thiazolidide (HAMH = 3-Amino-2-hydroxy-5-methyl-hexanoyl, HAPB = 3-Amino-2-hydroxy-4-phenyl-butanoyl) und deren Salze als APP-Inhibitoren,

Captopril, Enalapril, Lisinopril, Cilazopril und deren Salze als ACE-Inhibitoren, Postatin, Eurystatin A oder B, N^a-geschützte Peptidaldehyde, vorzugsweise Benzyloxycarbonyl-L-Prolyl-L-Prolinal bzw. Benzyloxycarbonyl-L-Thiopropyl-L-Thioprolinal, N^a-geschützte Aminosäure(Xaa)-pyrrolidide bzw. -thiazolidide (Xaa = α -Aminosäure, bevorzugt L-Alanin, L-Valin, L-Isoleucin) sowie die entsprechenden 2-Cyanopyrrolidid- bzw. 2-Cyanothiazolididderivate, substratanaloge N^a-geschützte Peptidphosphonsäurediarylester bzw. Peptiddiazomethylketone bzw. Peptidammoniummethylketone und deren Salze als POP (PEP)-Inhibitoren fungieren.

11. Pharmazeutische Zubereitung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, umfassend zwei oder mehrere der Inhibitoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität, der APN bzw. APN-analoger Enzymaktivität, des ACE, der POP (PEP) und der XPNPEP2 in räumlich getrennter Formulierung in Kombination mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen zur gleichzeitigen oder zeitlich unmittelbar aufeinanderfolgenden Verabreichung mit dem Ziel einer gemeinsamen Wirkung.

12. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 7 bis 11 für die systemische Anwendung zur oralen, transdermalen, intravenösen, subcutanen, intracutanen, intramuskulären, rektalen, vaginalen, sublingualen Applikation zusammen mit an sich bekannten Träger-, Hilfs- und/oder Zusatzstoffen.

13. Pharmazeutische Zubereitung gemäß Ansprüche 7 bis 11 für die topische Anwendung in Form von z. B. Cremes, Salben, Pasten, Gelen, Lösungen, Sprays, Liposomen, Schüttelmixturen, Hydrokolloidverbänden bzw. anderen dermatologischen Grundlagen/Vehikeln, einschließlich instilativer Applikation.